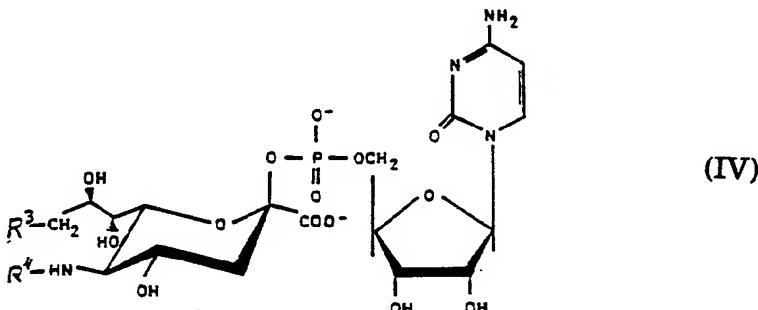




(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C07H 19/10, 21/00, C12P 19/30 G01N 33/574, A61K 31/70	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/14697 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Oktober 1991 (03.10.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00530		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.
(22) Internationales Anmeldedatum: 19. März 1991 (19.03.91)		
(30) Prioritätsdaten: P 40 09 630.0 26. März 1990 (26.03.90) DE		
(71)(72) Anmelder und Erfinder: BROSSMER, Reinhard [DE/DE]; Kurt-Lindemann-Str. 21, D-6903 Neckargemünd (DE). GROSS, Hans, Jürgen [DE/DE]; Ringstraße 5, D-6901 Dossenheim (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(74) Anwalt: ZELLENTIN UND PARTNER; Rubensstr. 30, D-6700 Ludwigshafen (DE).		

(54) Title: CMP-ACTIVATED FLUORESCENT DIALINIC ACIDS AND PROCESS FOR PRODUCING THEM

(54) Bezeichnung: CMP-AKTIVIERTE FLUORESZIERENDE SIALINSÄUREN SOWIE VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG



(57) Abstract

The present invention concerns a process for producing CMP-activated fluorescence indicator marked sialinic acids of the formula IV in which either R³ is the group Fl - Sp - X' - Nh - and R⁴ is an acyl group or R³ is a hydroxy or acylamino group and R⁴ is the group Fl - Sp - X' - NH - Acyl, Fl is a fluorescent group, Sp is a valency or a coupling spacer group and X' is a -CO-, -CS-, -SO₂- or triazinyl group, and the novel CMP-activated fluorescence indicator marked sialinic acids and their use for a) activity determination of sialyl transferases, b) acceptor specificity determination and determination of the kinetic acceptor data, c) fluorescence marking of cell surfaces, d) marking of glyco-proteins and gangliosides.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von CMP-aktivierten fluoreszenzindikatormarkierten Sialinsäuren der Formel (IV), wobei entweder R³ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - und R⁴ eine Acylgruppe oder R³ eine Hydroxy- oder Acylamino-Gruppe und R⁴ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - Acyl bedeutet, Fl eine fluoreszierende Gruppe, Sp eine Valenz oder eine kuppelnde Spacergruppe und X' eine -CO-, -CS-, -SO₂- oder Triazinyl-Gruppe bedeutet, sowie die neuen CMP-aktivierten fluoreszenzindikatormarkierten Sialinsäuren und ihre Verwendung zur a) Aktivitätsbestimmung von Sialyltransferasen, b) Akzeptorspezifitätsbestimmung und Bestimmung der kinetischen Akzeptordaten, c) Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächen, d) Markierung von Glykoproteinen und Gangliosiden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

CMP-aktivierte fluoreszierende Sialinsäuren sowie
Verfahren zu ihrer Herstellung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neues Verfahren zur Herstellung von CMP-aktivierten, fluoreszierenden bzw. absorbierenden sowie neue, CMP-aktivierte fluoreszierende bzw. absorbierende Sialinsäuren.

Sialinsäuren (auch als Acylneuraminsäuren bezeichnet) sind Bestandteile vieler bakterieller und tierischer Glykoproteine und Glykolipide. Bei Entzündungen, gewebszerstörenden Prozessen und bestimmten Tumorerkrankungen werden auch im Blutplasma höhere Konzentrationen an Sialinsäuren, insbesondere 5-N-Acetylneuraminsäure, und erhöhte Aktivitäten von sogenannten Sialyltransferasen gefunden. Letztere bauen physiologischerweise intrazellulär die Sialinsäure in Glykonjugate ein; es handelt sich um Glycoprotein-Enzyme, welche eine definierte Spezifität für die Glycansequenz des Glykokonjugat-Akzeptors, in welchem die Sialinsäure eingebaut wird, und für den glycosidischen Bindungstyp, in welchem die eingebaute Sialinsäure chemisch gebunden wird, haben. Sowohl der Nachweis der Sialinsäurekonzentration im Blut und Gewebe, insbesondere auch das Sialylierungsmuster auf der Zellmembranoberfläche, als auch der Nachweis der Sialyltransferaseaktivität und -spezifität in Zellen oder Körperflüssigkeiten wird in zunehmendem Maße für die medizinische Diagnostik interessant.

Problematisch beim Nachweis solcher Enzyme ist es, daß sie normalerweise in außerordentlich geringer Aktivität vorliegen, so daß direkte Nachweismethoden schwierig sind. Nach dem Stand der Technik wurden deshalb radioaktiv markierte

CMP-aktivierte Sialinsäuren als Substrate eingesetzt, um Sialyltransferase-katalysierte Umsetzungen zu bestimmen. (Vgl. Beyer et al. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 52, 23-175 (1981)). Außer, daß es an vielen Orten schwierig ist, radioaktive Substanzen zu handhaben, ist dieses Verfahren zeitaufwendig und teuer.

Es bestand daher ein Bedürfnis nach einer einfacheren, problemloser zu handhabenden Markierungssubstanz, mit der auch geringe Mengen an Umsetzungsprodukten der Sialyltransferase-reaktion sicher, einfach und empfindlich nachgewiesen werden können.

In Eur. J. Biochem. 177 583-589 (1988) ist deshalb ein Verfahren beschrieben, 9-Amino-5-N-acetyl-neuraminsäure mit Fluoresceinyl-Isothiocyanat zu kuppeln, welches gemäß dem von Groß und Brossmer, Glycoconjugate J., (1987), Volume 4, 145-176, bzw. Eur. J. Biochem. (1987) 168, 595-602, beschriebenen Verfahren mit CMP gekuppelt werden kann. Die auf diese Weise hergestellte Fluorescein-markierte CMP-Sialinsäure erweist sich als Indikator den bekannten radioaktiv-markierten CMP-Sialinsäuren gegenüber überlegen. Sowohl die Darstellung der Fluoresceinyl-N-acetylneuraminsäure als auch die anschließende CMP-Aktivierung verlaufen aufgrund der schlechten Umsetzung und vielfältigen Reinigungsschritte nur mit einer Ausbeute von etwa 5 %, bezogen auf die anfangs eingesetzte 9-Amino-5-N-acetylneuraminsäure. Es bestand daher ein Bedürfnis, diese Substanz auf einfachere Weise und mit höherer Ausbeute herzustellen und damit preiswerter zur Verfügung zu stellen.

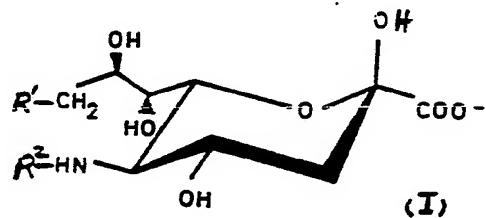
Überraschenderweise wurde gefunden, daß man diese Verbindung sowie andere, bisher nicht bekannte CMP-aktivierte, fluoreszierende Sialinsäurederivate auch herstellen kann, indem man zunächst 9-Amino-5-N-acetylneuraminsäure mit CMP verknüpft, wie es in der Literatur beschrieben ist (vgl. Groß et al.

Eur. J. Biochem. (1987) 168, 595-602). Diese Umsetzung verläuft mit hoher Ausbeute (95 %) und auch die Reinigung des Endproduktes ist vergleichsweise einfach. Anstelle der bevorzugten 5-Acetyl-Gruppe kann auch eine andere Acylgruppe vorhanden sein. Freie 5-Aminogruppen sind nicht geeignet, da diese Verbindungen nicht stabil sind.

Erfindungsgemäß kann das so erhaltene Produkt nunmehr mit einer aktivierten fluoreszierenden Verbindung, beispielsweise mit Fluorescein-isothiocyanat gekuppelt werden. Auch diese Umsetzung verläuft überraschenderweise mit sehr hoher Ausbeute und vergleichsweise einfacher Reinigung der Endprodukte, obwohl zu vermuten gewesen war, daß zahlreiche Nebenreaktionen durch die Vielzahl der möglichen reaktiven Zentren eintreten würden und daß eine erhebliche Zersetzung der CMP-Glykoside eintreten würde. Weitere Untersuchungen zeigten, daß dieses Verfahren nicht nur bei Fluoresceinverbindungen eingesetzt werden kann, sondern daß auch praktisch alle anderen fluoreszierenden Verbindungen, welche eine kupplungsfähige Hydroxy-, Amino-, Carboxy-, Triazinyl- oder Sulfonsäuregruppe enthalten mittels geeigneter Aktivatoren bzw. kuppelnder Verbindungen an eine CMP-aktivierte 9-Amino-N-acetylneuraminsäure gebunden werden könnten. Es hat sich weiterhin gezeigt, daß die biochemische Aktivität (d.h. die enzymkinetischen Daten) solcher Verbindungen sogar noch gesteigert wird, wenn die fluoreszierende Gruppe nicht über die Aminogruppe in 9-Stellung, sondern über eine Aminogruppe in der 5-Stellung der N-Acetylneuraminsäure gebunden wird, wobei in letzterem Fall zuerst noch eine Omega-Amino-Acylgruppe, beispielsweise β -Aminoacetyl, als Spacer an die 5-Aminogruppe ankondensiert wird. Obwohl dieser fluoreszente Rest dann dem glycosidischen Zentrum und damit der bedeutssten Position für die enzymatische Katalyse räumlich näher kommt, und obwohl bis dato die N-Acetyl-Gruppe an dieser Position stets als wichtiges Strukturmerkmal für die Enzym-Substrat-Interaktion angesehen wurde, weisen verschiedene Sialyltransferasen zu solchen Verbindungen im Vergleich zu

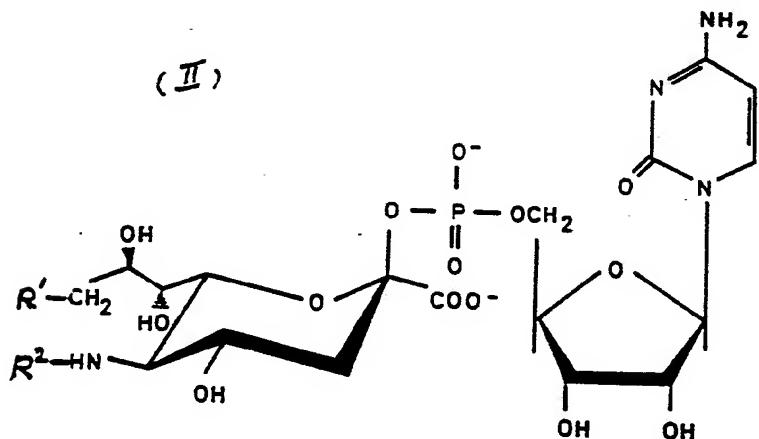
der entsprechenden Substitution in der 9-Stellung jeweils sogar eine höhere Affinität (d.h. kleinere Michaelis-Konstante) auf. Gleichermassen hat sich gezeigt, daß die fluoreszierenden Gruppen, welche relativ hydrophob sind, die Affinität der meisten Sialyltransferasen zum CMP-Glykosid erhöhen, und somit als Indikatoren mit Vorteil eingesetzt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren besteht demgemäß darin, eine 5-Acylamido-9-amino-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure oder 5-Aminoacylamido-3,5-didesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure der Formel I (im folgenden kurz als 9-Amino-5-N-acyl-Neu bzw. 5-Aminoacyl-Neu bezeichnet), der Formel I



in der R¹ eine Aminogruppe und R² eine Acylgruppe oder R¹ eine Hydroxygruppe oder Acylaminogruppe und R² eine Aminoacylgruppe darstellt

mit Cytidintriphosphat (CTP) in Gegenwart einer CMP-Sialinsäuresynthase zu CMP-aktivierten Sialinsäuren der Formel II

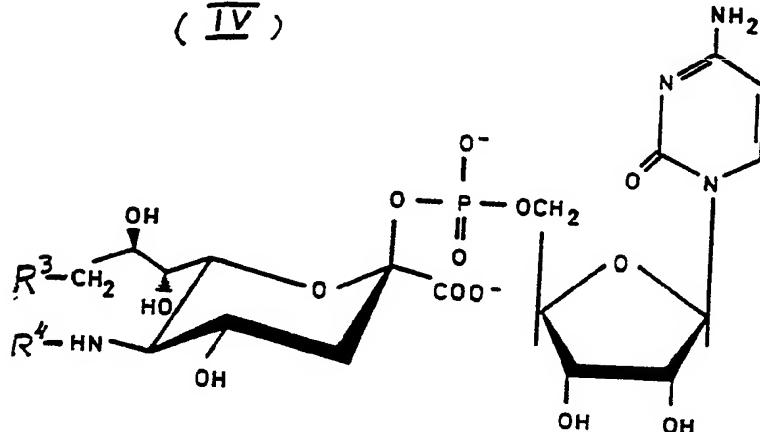


in der R¹ und R² die obige Bedeutung haben,
umzusetzen, und diese mit einer fluoreszierenden Verbindung
der Formel III



in der F1 eine fluoreszierende Verbindung,
 Sp eine Valenz oder eine kuppelnde Spacergruppe und
 X eine aktivierte Carboxy- oder Thiocarbonyl-, Triazinyl-
 oder Sulfonsäuregruppe bedeutet.

zu CMP-aktivierten, fluoreszierenden Sialinsäuren der Formel IV umzusetzen:



wobei entweder R³ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - und
R⁴ eine Acylgruppe oder
R³ eine Hydroxy- oder Acylamino-Gruppe und
R⁴ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - Acyl bedeutet, und
Fl und Sp jeweils die obige Bedeutung haben und
X' eine -CO-, -CS-, -SO₂- oder Triazinyl-Gruppe bedeutet.

Die aktivierte Säuregruppe X ist eine mit einer Aminogruppe chemisch reagierende Gruppe, und zwar entweder zu einem

Amid, z.B. ein Ester, Säurechlorid, Säureazid, oder zu einem Harnstoff bzw. Thioharnstoff, z.B. ein Isocyanat, Isothiocyanat oder zu einem Aminotriazin, z.B. eine Triazinyldichlorid-Gruppe. Entsprechende Reaktionen sind für die Bildung von Säureamiden gut bekannt. Äquivalente Gruppen sollen daher ebenfalls mit umfaßt sein.

Die Gruppe Sp ist überwiegend eine Valenz, da die absorbierenden bzw. fluoreszierenden Verbindungen häufig eine kuppungsfähige Gruppe X' direkt am Chromophor enthalten. In anderen Fällen kann jedoch auch eine Seitenkette, insbesondere eine Alkylkette mit 1-10, vorzugsweise 2-6 C-Atomen, zwischengeschaltet sein. Mittels einer Halogenalkylcarbonäure oder Halogenalkylsulfonsäure läßt sich eine solche Gruppe leicht zusammen mit einer kuppelnden Gruppe X an eine Hydroxy- oder Aminogruppe des Chromophors anknüpfen.

Reaktionsprinzip:

Die Ausgangssubstanz für die Synthese von CMP-aktivierten fluorescenten Neuraminsäureanaloga ist CMP-9-Amino-N-acetylneuraminsäure oder CMP-5-Aminoacetamido-neuraminsäure; außerdem eignen sich alle 5-substituierte Analoga mit längeren Ketten (z.B. N-(ϵ -Aminocaproyl)-neuraminsäure) an C-5 analog zur 5-Aminoacetyl-Gruppe.

Die Reaktion erfolgt durch Verknüpfung der Ausgangsmaterialien über die primäre Aminogruppe an Position C-9 oder C-5 mit verschiedenen reaktiven fluoreszenten oder absorbierenden Substanzen, die leicht mit einer Aminofunktion reagieren. Aktivierte Substituenten können vorliegen als Isothiocyanate, Isocyanate, als N-Hydroxysuccinimidester, p-Nitrophenylester, Sulfonsäurechloride, als Triazinchloride oder als Säureazide.

Die Reaktion erfolgt in teilweise wässrigem Milieu im neutralen oder alkalischen pH-Bereich (7.5 - 10; am besten

erfolgt die Reaktion bei pH 8.5 - 9) bei 20° C oder besser 37° C, mit Zusatz von organischem Lösungsmittel zur Solubilisierung der reaktiven Substanz (z.B. 30 % - 80 % Methanol, DMF, DMSO, Aceton oder Acetonitril, o.ä.). Das CMP-Glykosid Ausgangsmaterial und das gebildete CMP-NeuAc Analogon bleibt im genannten pH- Bereich stabil (weniger als 5 % Zersetzung). Der Überschuß an aktiviertem fluoreszentem Agens kann bei Isothiocyanaten nur 2-fach betragen, um über 90 % umgesetztes CMP-Glykosid zu erreichen; bei N-Hydroxysuccinimidestern liegt er besser bei 3-5 fach um den gleichen Umsatz zu erreichen; prinzipiell ist ein 10-facher Überschuß günstig zur Verkürzung der Reaktionszeit (bei Isothiocyanaten im Regelfall 10 - 15 min bei 37° C, bei N-Hydroxysuccinimidestern bis 20-30 min). Bei Triazinylchlorid als reaktive Gruppe empfiehlt sich ein höherer Überschuß (6 bis 15-fach), die Reaktionszeit bis zum kompletten Umsatz (90 %) beträgt mindestens 15-20 h bei 37° C.

In allen Fällen wird eine Umsetzung zum fluoreszenten bzw. absorbierenden CMP-NeuAc Analogon von 90 % oder mehr erreicht. Anschließend wird das synthetisierte fluoreszente bzw. absorbierende CMP-NeuAc Analogon über präparative HPLC gereinigt (vgl. Groß und Brossner, Eur. J. Biochem 177, 583-89). ("Spherisorb NH₂" (Zinsser), Aminoprepyl (Serva), "Lichroprep NH₂" (E. Merck) als stationäre Phase und 15 mM KH₂PO₄ in Wasser / 50-70 % Acetonitril als mobile Phase).

Vorteile der neuen Methode

Zum ersten Mal wurden mit dieser Methode neue CMP-NeuAc Analoga direkt aus einem CMP-Glykosid chemisch dargestellt. Der Vorteil der hier gezeigten Methode ist die direkte Verknüpfung des reaktiven Substituenten mit einer Aminogruppe eines CMP-Glykosids; dadurch entfällt eine langwierige und aufwendige chemische Synthese zuerst der entsprechenden freien NeuAc Analoga, deren Reinigung und die anschließende enzyma-

tische Aktivierung jedes freien NeuAc Analogons mit CMP-Sialinsäuresynthase mit nachfolgender, weiterer Reinigung. Nach der erfindungsgemäßen chemischen Synthese muß lediglich eine einfache Reinigungsprozedur durchgeführt werden. Außerdem liegen die Ausbeuten bei dieser enzymatischen Umsetzung von freien NeuAc Analoga mit großen fluoreszenten Substituenten an C-9 oder C-5 wesentlich niedriger (etwa 15 %), wie an der enzymatischen Synthese von CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc gezeigt wurde. Dagegen kann CMP-9-Amino-NeuAc mit optimaler Ausbeute von 95 % über CMP-NeuAc Synthasereaktion hergestellt werden. Die Knüpfungsreaktion von fluoreszenten Substituenten an CMP-9-Amino-NeuAc verlaufen ebenfalls mit Umsatzraten von 90 % und mehr, so daß die neue Methode optimale Ausbeute garantiert. Die Methode ist also ökonomisch, einfach und zeitsparend, und ermöglicht eine Vielfalt von CMP-NeuAc Analoga durch die Vielfalt der möglichen, aktivierte Substituenten herzustellen. Die bekannte Instabilität der CMP-Glykoside stellt dabei keinen Hinderungsgrund dar, da speziell CMP-9-Amino-NeuAc im geschilderten pH-Bereich (pH 7.5 - 9.5) überraschend stabil ist.

Charakteristik der dargestellten CMP-NeuAc Analoga:

Die neuen fluoreszenten oder absorbierenden CMP-Glykoside wurden nach der Reinigung mit verschiedenen Methoden charakterisiert (siehe folgende Tabelle).

1. Die Retentionszeit im analytischen HPLC-System (275 nm) unterschied sich vom CMP-9-Amino-NeuAc bzw. CMP-5-Aminoacetamido-Neu, der Absorptionskoeffizient (ϵ) der neuen CMP-Glykoside im HPLC-System bei 275 nm lag über 1.0 (bezogen auf $\epsilon_{275\text{nm}}$ von CMP).

2. Durch milde saure Hydrolyse (1N HCl, 45 min bei RT) wurden die neuen CMP-Glykoside vollständig zu CMP zersetzt und nachfolgend durch analytische HPLC (275 nm) bestimmt. Im analytischen HPLC-System bei 200 nm erscheint nach saurer Hydrolyse der Peak des freigesetzten, fluoreszenten bzw. absorbierenden NeuAc Analogons.
3. Das Absorptionsspektrum und das Fluoreszenzspektrum der neuen CMP-Glykoside wurde gemessen; die Absorptions- oder Fluoreszenzmaxima der fluoreszenten bzw. absorbierenden Substituenten konnten praktisch bei identischer Wellenlänge im neuen CMP-Glykosid wiedergefunden werden (siehe folgende Tabelle).
4. Die Kontamination mit freiem CMP oder freiem NeuAc Derivat lag bei den neuen CMP-Glykosiden unter 6 %, CTP war kleiner 0,1 %, und anorganisches Phosphat unter 50 %.

Die erfindungsgemäßen neuen Substrate lassen sich für folgende analytische Methoden einsetzen:

1. Aktivitätsbestimmung von Sialyltransferase
2. Akzeptorspezifitätsbestimmung und Bestimmung der kinetischen Akzeptordaten von Sialyltransferasen
3. Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächen
4. Markierung von Glykoproteinen und Gangliosiden

Charakteristik einiger fluorescenter CMP-Glykoside

alle fluoreszenden CMP-NeuAc Analoga wurden nach dem beschriebenen Verfahren dargestellt

fluoreszente CMP-Glykoside (Nomenklatur analog Seite 23 . . .)	Absorptions- maximum * (zw. 230-700 nm)	Absorptions- maximum ** (Literatur)	Retentionszeit im HPLC-System * (Peakmaximum)	Absorptionskoeffizient ϵ (275 nm) im HPLC-System (be- zogen auf ϵ (275 nm) von CMP)
CMP-9-Fluoresceinylamino- NeuAc (CMP-9-FITC-NeuAc)	492 nm	495 nm	24,5 min	3,2 ± 0,2
CMP-5-Fluoresceinylamino- acetyl-Neu (CMP-5-FITC-Neu)	493 nm	495 nm	44,5 min	3,2 ± 0,2
CMP-9-N-(Fluoresceinylamino- chlorotriazinyl)-amino-NeuAc (CMP-9-DTAF-NeuAc)	1. Max 233 nm 2. Max 493 nm	492 nm	21,5 min	4,25 ± 0,35
CMP-9-Tetramethyl- rhodaminylamino-NeuAc (CMP-9-TRITC-NeuAc)	552 nm	554 nm	28,1 min	2,4 ± 0,3
CMP-9-Resorufinyl-amino- NeuAc (CMP-9-RESOS-NeuAc)	577 nm	575,6 nm	47,5 min	1,8 ± 0,15
CMP-9-(7-Amino-4-methyl-) cumarinylacetamido-NeuAc (CMP-9-AMCA-NeuAc)	339 nm	345 nm	17,5 min	1,2 ± 0,15
Referenz CMP	273 nm	273 nm	8,5 min	1,0

* gemessen in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0

** HPLC-System wie beschrieben: Groß et al., Eur.J.Biochem. (1987) 168, 595-602
Flußrate 3 ml/min; Detektion bei 275 nm; 40% 15 mM KH₂PO₄/ 60% Acetonitril

*** Absorptionsmaximum der aktivierten Fluoreszenzsubstituenten (FITC, TRITC, DTAF, RESOS, AMCA) nach
Katalog/Literatur

I. Messung der Sialyltransferaseaktivität

Der Test basiert auf dem Einbau der fluoreszierenden Neuraminsäurederivate aus dem entsprechenden CMP-Glykosid durch eine Sialyltransferase in einen Akzeptor, beispielsweise ein Glykoprotein oder Gangliosid, Trennung der substituierten und unsubstituierten Akzeptormoleküle von dem Überschuß der Reagenzien durch Gelfiltration oder Ausfällung und Messung der akzeptorgebundenen Fluoreszenz durch ein entsprechendes spektrometrisches Verfahren. Diese Methode eignet sich zur Bestimmung aller bisher bekannten Sialyltransferasen, trotz unterschiedlicher Bindungs- (α 2,3-; α 2,6-) und Akzeptorspezifität ($\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}-$; $\text{Gal}\beta 1,4(3)\text{GlcNAc}-$; $\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}-$; $\text{GalNAc}-$), da offenbar generell die Substratspezifität in bezug zur Position C9 oder C5 der CMP-aktivierten Neuraminsäuren gering ausgeprägt ist. Wie vorstehend gesagt, erweisen sich C5-substituierte Neuraminsäuren und durch hydrophobe Substituenten substituierte Neuraminsäuren als Substrate mit besonders hoher Affinität.

Für einen einfachen Test werden normalerweise 30 μl Reaktionslösung, oder gegebenenfalls bis zu nur 10 μl Reaktionslösung benötigt. Diese enzymatische Reaktion wird beispielsweise in einem Puffer mit pH 6 oder 6,5 durchgeführt (je nach dem pH Optimum der Sialyltransferase), wobei 0,1 - 10,0 mg/ml Akzeptor [(Asialo)Glykoprotein oder Gangliosid], entsprechend 690 - 1.875 μM Galaktose oder N-Acetylgalaktosaminakzeptorstellen, und 10 - 100 μM der jeweiligen CMP-aktivierten fluoreszenten N-Acetylneuraminsäurerеагентien zugegeben werden. Die Reaktionslösung wird im Regelfall 10 min bis 45 min bei 37° C gehalten und anschließend an einer Sephadex G50-Säule (0,4 x 12 cm) mit 0,1 M Trispuffer

pH 8,6 getrennt [bei Gangliosidakzeptoren enthält der Puffer zusätzlich 100 mM NaCl und 0,3 % Detergenz (z.B. Triton X-100)]. Das Ausmaß der Reaktion wird über eine Fluoreszenzmessung der makromolekular gebundenen fluoreszenten Neuraminsäure quantifiziert, kann auch gegebenenfalls über eine Messung des nicht-umgesetzten fluoreszenten CMP-Glykosids bestimmt werden. Im Gegensatz zu radiometrischen Tests für Sialyltransferaseaktivität reichen wesentlich kleinere Konzentrationen der fluoreszenten CMP-Glykoside (5-15-fach kleiner) aus, um das Enzym mit dem CMP-Glykosid zu sättigen, und die geringen zur Fluoreszenzmessung nötigen Volumina ermöglichen geringe Reaktionslösungen (bis min. 10 µl), was die Methode insgesamt sehr ökonomisch macht. Trotzdem ist die Meßempfindlichkeit des fluorometrischen Tests in einem radiometrischen Test nur schwer zu erreichen (erfordert sehr hohe spezifische Radiomarkierung).

Der Test eignet sich in dieser Form auch besonders zur Messung der geringen Sialyltransferaseaktivitäten in Kulturzelllinien, Operations- oder Biopsiematerial und in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Blutplasma oder -serum.

Als Alternative zur Gelfiltration ist bei Glykoprotein-Akzeptoren eine Fällung zur Trennung vom Donor möglich; dazu wird ein Assay wie oben mit 1 ml 1 % PWS in 0,5N HCl bei 4° C und 20 min präzipitiert. Das Sediment wird 2-mal gewaschen mit Ethanol/0,1M Tris pH 7,5 (9/1) und gelöst in einem geeigneten Volumen 1 N NaOH (PWS = Phosphorwolframsäure).

II. Sialyltransferasen verschiedener Herkunft weisen teilweise erhebliche Unterschiede in ihrer Akzeptorsubstratspezifität auf. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Indikatoren läßt sich daher eine leichte Unterscheidungsreaktion darauf aufbauen, den vorstehenden Test unter standardisierten Bedingungen jeweils mit verschiedenen Akzeptoren (d.h. Glycoprotein-, Glykolipid- oder Oligosaccharid-Akzeptoren mit unterschiedlichen Glykansequenzen) durchzuführen, und die jeweils gefundene Aktivität zu vergleichen.

Der Test ermöglicht auch die Erstellung der enzymkinetischen Daten (Michaelis-Konstante, V_{max}) für den jeweiligen Akzeptor. Im Plasma bzw. Serum ermöglicht der Test zum ersten Mal eine Differenzierung von zwei Sialyltransferasen, eine mit Spezifität für die N-gebundene, terminale Glycansequenz Gal β 1,4GlcNAc, eine andere für O-gebundene GalNAc-Reste.

III. Es ist ferner möglich, die Sialinsäureakzeptoren auf Zellmembranen auf einfache Weise mit den erfindungsgemäßen Indikatoren zu markieren, indem man eine entsprechende Reaktionslösung der CMP-aktivierten fluoreszenten Sialinsäuren in Gegenwart von Sialintransferase einwirken läßt, den Überschuß des Indikators auswäsch und am Ausmaß der Fluoreszenz der isolierten Zellen Oberflächeneigenschaften bestimmter, zu untersuchender Zellen bestimmt. Außerdem kann die Zelle auf diese Weise selektiv im Glykanteil fluoreszenzmarkiert werden, ohne eine chemische Wärmebehandlung. Die Messung der oberflächengebundenen Fluoreszenz erfolgt sehr einfach im Durchflußcytometer, kann aber auch unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

IV. Die erfindungsgemäßen Verbindungen erweisen sich ferner als vorteilhaft, wenn gewisse, in ihrer räumlichen Struktur besonders empfindliche Proteine fluoreszenzmarkiert werden sollen, um sie bei Einsatz in einem biologischen System anhand der Fluoreszenz verfolgen zu können. Eine solche Markierung kann enzymatisch relativ schonend und vollständig durchgeführt werden, lässt die eigentliche Aminosäuresequenz des Proteins unmodifiziert, erfolgt selektiv in bestimmten Glykansequenzen und ermöglicht, die überflüssige Indikatorsubstanz leicht wieder abzutrennen. Die Verfahrensweise ist prinzipiell die gleiche wie unter I. geschildert.

Bevorzugte fluoreszente bzw. absorbierende CMP-Glykoside

(Abgekürzte Nomenklatur analog Seite 23)

- CMP-9-TRITC-NeuAc: diese Substanz wird praktisch nur von Gal β 1,4GalNAc α 2,6Sialyltransferasen auf Glykoproteine übertragen, könnte also zur Differenzierung dienen; außerdem andere Excitation und Emission (rot-fluoreszent).
- CMP-9-DTAF-NeuAc: stark hydrophob, bessere kinetische Daten für verschiedene Sialyltransferasen, besonders für Gal β 1,3GalNAc α 2,3-Sialyltransferase ist V_{max}/Kin 6,5 fach höher als für CMP-Fluores-ceinyl-NeuAc.
- CMP-9-RESOS-NeuAc: sehr gute Absorption im sichtbaren Bereich; bei Fluoreszenz andere Emmission auch Excitation als FITC; Fluoreszenz auch im sauren pH-Bereich im Gegensatz zu FITC.
- CMP-9-AMCA-NeuAc: Anregung im UV-Bereich, geringer "Innerer Quench" durch 100 nm Abstand zwischen Excitation und Emission; Fluoreszenz nicht pH-abhängig in einem weiteren Bereich.
- CMP-9-DAB-NeuAc: Anregung im UV-Bereich; hohe Absorption im UV-Bereich, daher gute Eignung für einen Absorptionsassay für UV-Durchflussspektrophotometers.

16

CMP-5-FITC-Neu:

Günstige Emission und Excitationsfrequenzen bei hoher Fluoreszenzausbeute. Kinetische Daten bei Sialyltransferasen verschiedendster Akzeptorspezifität stets denen von CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc überlegen (V_{max}/Kin : 2,8-20 fach höher).

CMP-Sialinsäurederivate ausgewählt aus der Gruppe
jeweils: Trivialname
exakte chemische Nomenklatur
abgekürzter Trivialname

CMP-9-Tetramethylrhodaminylamino-NeuAc

CMP-[5-Acetamido-9-(3-Tetramethylrhodaminylthioureido)-3,5,9-tridesoxy]- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-TRITC-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 2, Rest C

CMP-9-Rhodaminylamino-NeuAc

CMP-[5-Acetamido-9-(3-Rhodaminylthioureido)-3,5,9-tridesoxy]- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(-.-)

CMP-9-Eosinylamino-NeuAc

CMP-[5-Acetamido-9-(3-Eosinylthioureido)-3,5,9-tridesoxy]- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(-.-)

CMP-9-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4)amino-NeuAc

CMP-[5-Acetamido-9-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4'-thioureido)-3,5,9-trideoxy]- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-DAB-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 2, Rest D

18

CMP-9-Fluoresceinyl-(5,6)carboxamido-NeuAc

CMP-5-Acetamido-[9-fluoresceinyl-(5,6)carboxamido]-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-FLUOS-NeuAc)

CMP-9-Rhodaminyl-(5,6)carboxamido-NeuAc

CMP-5-Acetamido-[9-rhodaminyl-(5,6)carboxamido]-3,5,9-tridesoxy]- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-RHODOS-NeuAc)

CMP-9-Resorufinyl-amino-NeuAc

CMP-5-Acetamido-9-[(N-resorufin-4-carbonyl)-piperidin-4-carboxamido]-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-RESOS-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 1, Rest A

CMP-9-(7-Amino-4-methyl-cumarinylacetamido)-NeuAc

CMP-5-Acetamido-9-(7-amino-4-methyl-coumarinylacetamido)-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-AMCA-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 1, Rest B

CMP-9-N-(Fluoresceinylamino-chlorotriazinyl)-amino-NeuAc

CMP-5-Acetamido-9-fluoresceinylamino-chlorotriazinylamino-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-9-DTAF-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 3, Rest E

CMP-9-Dansylamino-NeuAc

CMP-5-Acetamido-9-(dansylamido)-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

siehe Abb.: Struktur 3, Rest F

CMP-9-(Texas-Red)amino-NeuAc

CMP-5-Acetamido-9-N-(Texas-Red)amino-3,5,9-tridesoxy- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

CMP-5-Fluoresceinylaminoacetyl-Neu

CMP-3,5-Didesoxy-5-(fluoresceinylthioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-5-FITC-NeuAc)

siehe Abb.: Struktur 4, (Fluoresceinyl-Isomer I)

CMP-5-Tetramethylrhodaminylaminoacetyl-Neu

CMP-3,5-Didesoxy-5-(tetramethylrhodaminylthioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-5-TRITC-Neu)

CMP-5-Rhodaminylaminoacetyl-Neu

CMP-3,5-Didesoxy-5-(rhodaminylthioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(-.-)

CMP-5-Eosinylaminoacetyl-Neu

CMP-3,5-Didesoxy-5-(eosinylthioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(-.-)

CMP-5-Xanthenrhodaminylaminoacetyl-Neu

CMP-3,5-Didesoxy-5-(xanthenrhodaminylthioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

(CMP-5-XRITC-Neu)

CMP-5-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4')-aminoacetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4'-thioureido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-DAB-Neu)

CMP-5-Fluoresceinyl-(5,6)carboxamido-acetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-fluoresceinyl-(5,6)carboxamido-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-FLUOS-Neu)

CMP-5-Rhodaminyl-(5,6)carboxamido-acetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-rhodaminyl-(5,6)carboxyamido-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-RHODOS-Neu)

CMP-5-Resorufinylacetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-N-(resorufin-4-carbonyl)-piperidin-4-carboxamido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-RESOS-Neu)

CMP-5-(7-Amino-4-methyl-cumarinylacetamido)-acetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-N-(7-amino-4-methyl-cumarinylacetamido)-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-AMCA-Neu)

CMP-5-Fluoresceinylamino-chlorotriazinyl-aminoacetyl-Neu
CMP-3,5-Didesoxy-5-N-(fluoresceinylamino-chlorotriazinyl)-aminoacetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure
(CMP-5-DTAF-Neu)

CMP-5-Dansyl-aminoacetyl-Neu
CMP-5-Dansylamino-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

CMP-5-(Texas-Red)-aminoacetyl-Neu

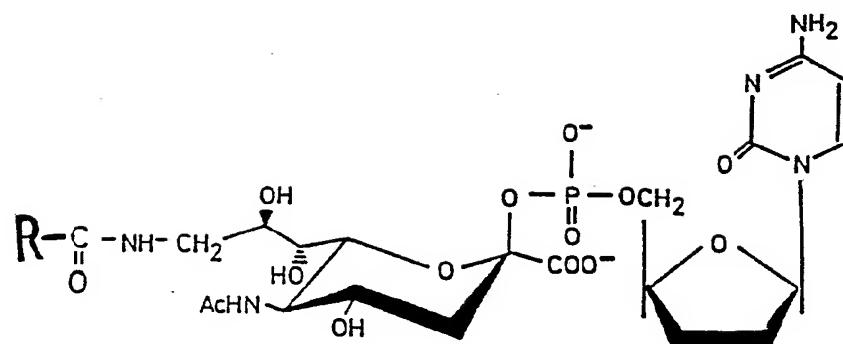
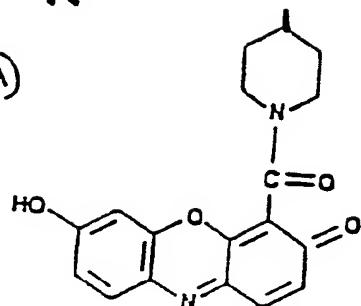
CMP-3,5-Dideoxy-5-N-(Texas-Red)amino-acetamido- β -D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure

22

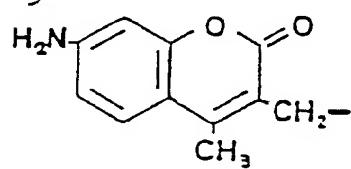
STRUKTUR 1

 $R =$

A)

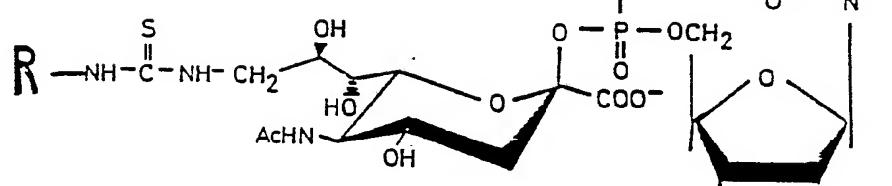
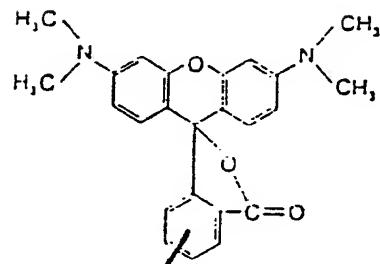


B)

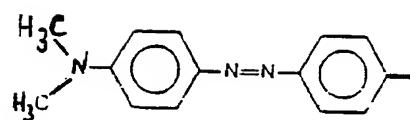
 $R =$

STRUKTUR 2

C)



D)

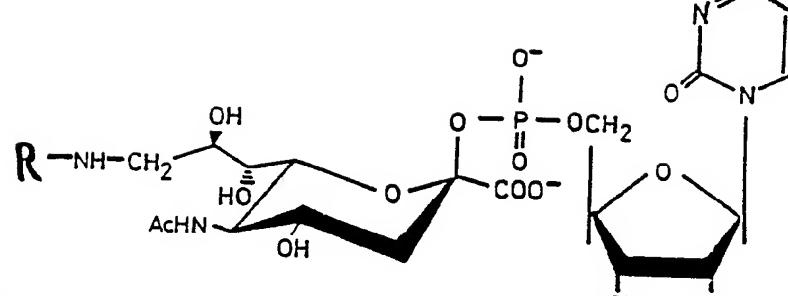
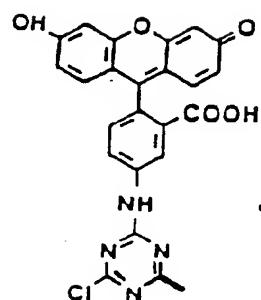


ERSATZBLATT

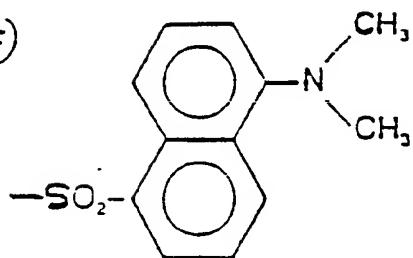
STRUKTUR 3

 $R =$

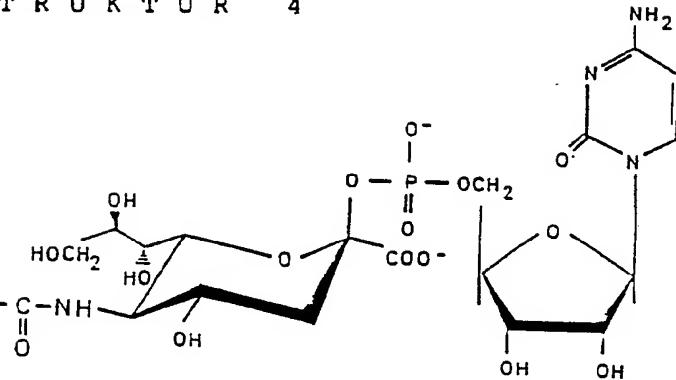
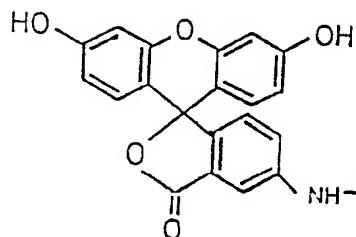
E)



F)



STRUKTUR 4



24

Darstellung von fluorogenen CMP-Glykosiden im Detail

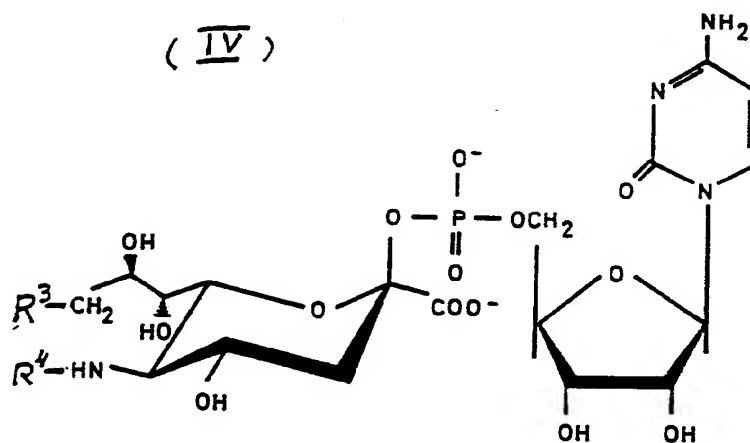
- a) Synthese CMP-9-Fluoresceinylamino-NeuAc (Nomenklatur analog Seite 23)
Fluoresceinylisothiocyanat (Isomer I oder II wird gelöst in Methanol oder DMF (1-4 mg ≈ ca. 2,5-10 µmol; in 200 µl), dann werden 1,25 µmol CMP-9-Amino-NeuAc, gelöst in 200 µl Wasser, zugegeben (2 Mol Fluoresceinylisothiocyanat pro Mol CMP-9-Amino-NeuAc sind ausreichend); dann werden 20 µl einer Pufferlösung pH 9-9,5 (z.B. 0,5 M NaHCO₃/Na₂CO₃) zugegeben, so daß pH 8,5-9 erreicht wird. Die Reaktion der Aminogruppe an C-9 des NeuAc-Teils des CMP-Glykosids mit dem Fluoresceinylisothiocyanat ist nach spätestens 15 min komplett (größer 90 %). Die Umsetzung kann über analytische HPLC beobachtet werden, die Retentionszeit von CMP-9-Amino-NeuAc ist wesentlich kleiner als die des gebildeten fluoreszenten CMP-Glykosids. Die Reinigung des erhaltenen CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc erfolgt über präparative HPLC und Ethanolfällung, wie beschrieben (Groß und Brossmer (1988), Eur. J. Biochem. 177, 583-89).
- b) Synthese von CMP-9-Resorufinyl-amino-NeuAc
0,5 mg N-(Resorufin-4-carbonyl-)piperidin-4-carbonsäure-N'-hydroxysuccinimidester (RESOS 0,5 mg ≈ ca. 1,1 µmol) wird gelöst in 100 µl DMF; dann werden 20 bis 80 µl einer wäßrigen Lösung von CMP-9-Amino-NeuAc (0,5 µmol) zugegeben, und 20 µl Puffer pH 9-9,5 (siehe Synthese CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc). Das pH der Reaktionslösung sollte 8,5-9 haben, die Bildung von CMP-9-Resorufinyl-NeuAc (Ausbeute über 90 %) ist nach 20 min komplett (analyt. HPLC wie oben). Die Reinigung erfolgt wie bei CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc.

25

- c) Synthese vom CMP-5-Fluoresceinylaminoacetyl-NeuAc
Die Synthese erfolgt exakt wie für CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc oben beschrieben, aber mit CMP-5-Aminoacetamido-Neu als Ausgangsmaterial (2 Mol Fluoresceinylisothiocyanat/Mol CMP-5-Aminoacetamido-Neu). Die Kupplung wird mit über 90 % Ausbeute in 15 min erreicht (analyt. HPLC wie oben). Die Reinigung wird wie bei CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc durchgeführt.
- d) Synthese von CMP-9-N-(Fluoresceinylamino-chlorotriazinyl)-amino-NeuAc
2,0 mg (= 3,75 µMol) Dichlorotriazinylaminofluorescein, (DTAF) wurde gelöst in 100 µl DMF; dann wurden 20-50 µl einer wässrigen Lösung von CMP-9-Amino-NeuAc (max. 0,5 µMol) und 20 µl Puffer pH 9-9,5 (wie Synthese CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc) zugegeben (7,5-19 Mol DTAF/Mol CMP-9-Amino-NeuAC). Nach 3 h sind etwa 75 % der CMP-9-Amino-NeuAc umgesetzt, nach 15 h über 90 % (analyt. HPLC wie oben). Die Reinigung erfolgt wie bei CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc beschrieben.
- e) Synthese von CMP-9-(7-Amino-4-methyl-cumarinyl-acetamido)-NeuAc
0,3 mg AMCA-N-hydroxysuccinimidester (ca. 1 µMol) wurde gelöst in 130 µl DMF; dann wurden 70 µl einer wässrigen Lösung von CMP-9-Amino-NeuAc (ca. 0,5 µMol) und 30 µl Puffer pH 9-9,5 (wie Synthese CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc) zugegeben (2 Mol AMAC/Mol CMP-9-Amino-NeuAc). Nach 20 min sind etwa 90-95 % der CMP-9-Amino-NeuAc umgesetzt (analyt. HPLC wie oben). Die Reinigung erfolgt wie bei CMP-9-Fluoresceinyl-NeuAc beschrieben.

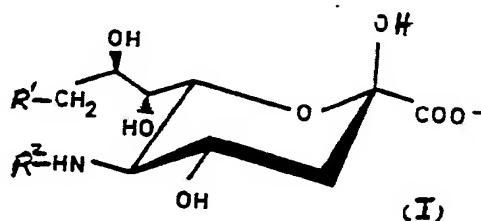
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von CMP-aktivierten Fluoreszenzindikatormarkierten Sialinsäuren der Formel IV



wobei entweder R³ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - und R⁴ eine Acylgruppe oder R³ eine Hydroxy- oder Acylamino-Gruppe und R⁴ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - Acyl bedeutet, Fl eine fluoreszierende Gruppe, Sp eine Valenz oder eine kuppelnde Spacergruppe und X' eine -CO-, -CS-, -SO₂- oder Triazinyl-Gruppe bedeutet,

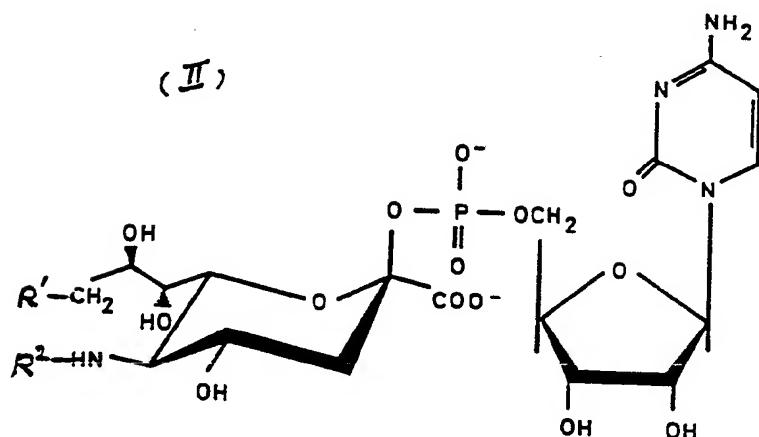
dadurch gekennzeichnet, daß man eine 9-Amino-5-N-acyl- oder 5-Aminoacyl-neuraminsäure der Formel I



27

in der R¹ eine Aminogruppe und R² eine Acylgruppe oder R¹ eine Hydroxy- bzw. Acylamino-Gruppe und R² eine Aminoacylgruppe darstellt,

mit Cytidintriphosphat (CTP) in Gegenwart des Enzyms CMP-Sialinsäuresynthase (E.C. 2.7.7.43) zu CMP-aktivierte Sialinsäuren der Formel II



umsetzt.

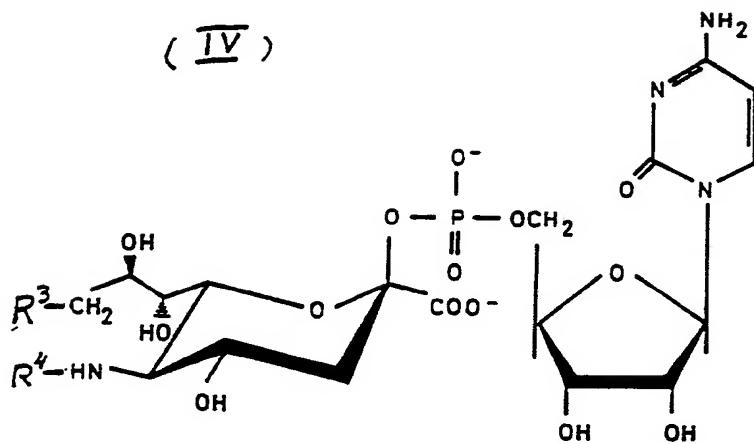
in der R¹ und R² die obige Bedeutung haben und diese mit einer fluoreszierenden Verbindung der Formel III

F1 - Sp - X

(III)

in der F1 eine fluoreszierende Gruppe, Sp eine Valenz oder eine kuppelnde Spacergruppe und X eine aktivierte Carboxy-, Thiocarbonyl-, Triazinyl- oder Sulfonsäuregruppe bedeutet,

zu CMP-aktivierten, fluoreszierenden Sialinsäuren der Formel IV umsetzt



wobei R³ und R⁴ die obige Bedeutung haben.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fluoreszenzindikator der Formel V



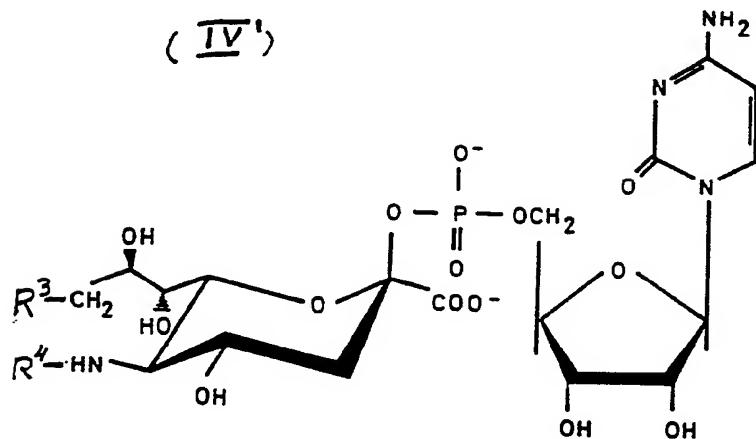
in der R⁵ eine Amino-, Hydroxy-, Carboxyl-, Triazinyl- oder Sulfonylgruppe darstellt und F1 eine fluoreszierende Gruppe bedeutet,

zunächst mit der aktivierend bzw. kuppelnd wirkenden Verbindung zu der aktiven Verbindung III



umgesetzt wird, welche danach mit der 9- bzw. 5-Aminogruppe der Sialinsäure der Formel II reagiert.

3. CMP-aktivierte Fluoreszenzindikatormarkierte Sialinsäure der Formel IV'



wobei entweder R³ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - und R⁴ eine Acylgruppe oder R³ eine Hydroxygruppe oder Acylamino-Gruppe, und R⁴ die Gruppe Fl - Sp - X' - NH - Acyl bedeutet, und Fl und Sp jeweils die obige Bedeutung haben und X' eine -CO-, -CS- oder -SO₂- oder Triazinyl-Gruppe bedeutet, wobei R³ nicht die Fluoresceinylgruppe ist.

4. CPM-Sialinsäure gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe -Sp- eine Alkylgruppe mit 1-10, insbesondere 2-6 C-Atomen ist.
5. CMP-Sialinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die fluoreszierende Gruppe Fl-Sp-X' an die 5-Stellung der Neuraminsäure gebunden ist, insbesondere eine Fluoresceinyl-thioureido-acetyl-Gruppe darstellt.

30

6. CMP-Sialinsäurederivate ausgewählt aus der Gruppe
 CMP-9-Tetramethylrhodamylaminolamino-NeuAc
 CMP-9-Rhodamylaminolamino-NeuAc
 CMP-9-Eosinylaminolamino-NeuAc
 CMP-9-Xanthenorhodamyl-NeuAc
 CMP-9-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4)amino-NeuAc
 CMP-9-Fluoresceinyl-(5,6)carboxamido-NeuAc
 CMP-9-Rhodamyl-(5,6)carboxamido-NeuAc
 CMP-9-Resorufinyl-amino-NeuAc
 CMP-9-(7-Amino-4-methyl-cumarinylacetamido)-NeuAc
 CMP-9-N-(Fluoresceinylamino-chlorotriazinyl)-amino-NeuAc
 CMP-9-Dansylamino-NeuAc
 CMP-9-(Texas-Red)amino-NeuAc
 CMP-5-Fluoresceinylaminoacetyl-Neu
 CMP-5-Tetramethylrhodamylaminolaminoacetyl-Neu
 CMP-5-Rhodamylaminolaminoacetyl-Neu
 CMP-5-Eosinylaminolaminoacetyl-Neu
 CMP-5-Xanthenorhodamylaminolaminoacetyl-Neu
 CMP-5-(4-N,N'-Dimethylaminoazobenzo-4')aminoacetyl-Neu
 CMP-5-Fluoresceinyl-(5,6)carboxamido-acetyl-Neu
 CMP-5-Rhodamyl-(5,6)carboxamido-acetyl-Neu
 CMP-5-Resorufinylacetyl-Neu
 CMP-5-(7-Amino-4-methyl-cumarinylacetamido)-acetyl-Neu
 CMP-5-Fluoresceinylamino-chlorotriazinyl-aminoacetyl-Neu
 CMP-5-Dansyl-aminoacetyl-Neu
 CMP-5-(Texas-Red)aminoacetyl-Neu

31

7. CMP-Sialinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe X' eine Ureido- oder Thioureido-Gruppe ist.
8. CMP-Sialinsäure gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe X' eine N-Hydroxysuccinamidgruppe ist.
9. Verwendung von CMP-aktivierten Fluoreszenzindikatormarkierten Sialinsäuren der Formel IV zur
 - a) Aktivitätsbestimmung von Sialyltransferasen
 - b) Akzeptorspezifitätsbestimmung und Bestimmung der kinetischen Akzeptordaten
 - c) Fluoreszenzmarkierung von Zelloberflächen
 - d) Markierung von Glykoproteinen und Gangliosiden

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP91/00530

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. 5 : C07H 19/10, 21/00, C12P 19/30, G01N 33/574, A61K 31/70

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched 7

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. 5	C07H 19/00, 21/00, C12P 19/00, G01N 33/00, A61K 31/00

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched 8

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category *	Citation of Document, 11 with indication, where appropriate, of the relevant passages 12	Relevant to Claim No. 13
X	Analytical Biochemistry, Vol. 186, No.1, 1990, Academic Press, Inc., H.J. Gross et al.: "A highly sensitive fluorometric assay for sialyltransferase activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as donor", pages 127-134 see the whole document	3
A	---	1,2
X	European Journal of Biochemistry, Vol. 177, No.3, November 1988, H.J. Gross et al.: "Enzymatic introduction of a fluorescent sialic into oligosaccharide chains of glycoproteins", pages 583-589, see the whole document, in particular page 584, column 1, lines 15-21; page 584, column 2, lines 21-28	3
A	cited in the application	1,2
A	---	1
	Chemical Abstracts, vol.77, No. 9, 28 August 1972, (Columbus, Ohio, US), R. Schauer et al.: "Synthesis of CMP-glycosides of radioactive N-acetyl-	

* Special categories of cited documents: 10

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

7 June 1991 (07.06.91)

Date of Mailing of this International Search Report

22 July 1991 (22.07.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	<p>N-Glycoloyl, N-acetyl-7-()-acetyl- and N-acetyl-8-O-acetylneuraminic acids by CMP-sialate synthase from bovine submaxillary glands", see page 152, abstract No. 57834u & Hoppe-Seyler's Z Physical Chem. 1972, 353(6), 883-6</p> <p>-----</p>	
A	<p>Chemical Abstracts, Vol. 109, NO.13, 26 September 1988, (Columbus, Ohio, US), Shaw, Lee et al.: "The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid", see page 401, abstract No.108046c & Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1988, 369(6), 477-86</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00530

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl. ⁵ C 07 H 19/10, 21/00, C 12 P 19/30, G 01 N 33/574, A 61 K 31/70		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl.	C 07 H 19/00, 21/00, C 12 P 19/00, G 01 N 33/00, A 61 K 31/00	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen. ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	Analytical Biochemistry, Band 186, Nr. 1, 1990, Academic Press, Inc., H.J. Gross et al.: "A highly sensitive fluorometric assay for sialyltransferase activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as donor", Seiten 127-134 siehe dans ganze Dokument	3
A	---	1,2
X	European Journal of Biochemistry, Band 177, Nr. 3, November 1988, H.J. Gross et al.: "Enzymatic introduction of a fluorescent sialic into oligosaccharide chains of glycoproteins", Seiten 583-589 siehe das ganze dokument, insbesondere Seite 584, Spalte 1, Zeilen 15-21; Seite 584, Spalte 2, Zeilen 21-28	3
./.		
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
7. Juni 1991	22 JUL 1991	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	MISS T. TAZELAAR	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
A	In der Anmeldung erwähnt ---	1,2
A	Chemical Abstracts, Band 77, Nr. 9, 28. August 1972, (Columbus, Ohio, US), R. Schauer et al.: "Synthesis of CMP- glycosides of radioactive N-acetyl- N-glycoloyl, N-acetyl-7-()-acetyl- and N-acetyl-8-O-acetylneuraminic acids by CMP-sialate synthase from bovine sub- maxillary glands", siehe Seite 152, Zusammenfassung Nr. 57834u & Hoppe-Seyler's Z Physical Chem. 1972, 353(6), 883-6 ---	1
A	Chemical Abstracts, Band 109, Nr. 13, 26. September 1988, (Columbus, Ohio, US), Shaw, Lee et al.: "The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid", siehe Seite 401, Zusammenfassung Nr. 108046c & Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1988, 369(6), 477-86 -----	1